

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659026

研究課題名(和文)核移行糖転移酵素を用いた核内N-アセチルグルコサミン修飾タンパク質同定法の確立

研究課題名(英文) A novel method to identify nuclear proteins modified with N-acetylglucosamine by using a soluble glycosyltransferase having nuclear-localization signal

研究代表者

山本 一夫 (Yamamoto, Kazuo)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20174782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体やゴルジ体の内腔で起こるタンパク質の糖鎖修飾とは異なり、細胞質内で起こる唯一の糖修飾が、セリン、スレオニン残基の N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)修飾である。可溶性の糖転移酵素を核内に発現させることによりO-GlcNAcを伸長させて安定な糖鎖に導いた。これによりO-GlcNAc修飾を受けたタンパク質を網羅的に同定すると共に、それらの修飾アミノ酸残基を特定する新規の手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Glycosylation of proteins occurs in the lumens of the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus, which resulted in diverse structures of carbohydrate moieties. By contrast, addition of N-acetylglucosamine (GlcNAc) to serine and threonine is a unique glycosylation reaction occurred in nucleus and cytoplasm. We expressed a soluble glycosyltransferase having nuclear-localization signal in the cell and induced further elongation of GlcNAc residue. By using lectin affinity chromatography and mass spectrometry, we comprehensively identified O-GlcNAc modified proteins and their GlcNAc-modified amino acid residues.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

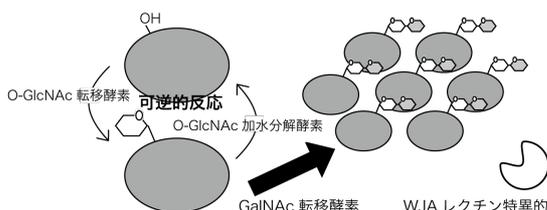
キーワード：生化学 糖鎖 翻訳後修飾 核内タンパク質

1. 研究開始当初の背景

小胞体やゴルジ体の内腔で起こるタンパク質の糖鎖修飾とは異なり、細胞質内で起こる唯一の糖鎖修飾が、セリン、スレオニン残基の *N*-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 修飾である。この糖は伸長反応が起こらず且つ修飾が可逆的である点でも性質を異にする。この糖修飾は可逆的であることから、僅かなもののみが修飾されているに過ぎず、修飾タンパク質の検出や修飾されたアミノ酸残基の特定が困難である。細胞質に存在するタンパク質の O-GlcNAc 修飾の発見は 20 年以上前に遡るが、その検出が困難を極め、O-GlcNAc 修飾されたヒストン H2A, H2B, H3, H4 の存在が報告されたのは、2010 年 12 月のことである (Sakabe et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2010)。転写因子等のリン酸化による活性化は広く知られていることから、O-GlcNAc 修飾がリン酸化と競合する反応と概念的には捉えられていたものの、修飾部位が特定されていないことから推測の域を出ていない。一方、O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) の阻害剤であるストレプトゾトシン (STZ)、O-GlcNAc 加水分解酵素 (O-GlcNAcase) の阻害剤である PUGNAc を用いて、転写因子などの O-GlcNAc 修飾を介して細胞の分化や増殖を誘導するという報告もいくつかなされた。さらに、O-GlcNAc を認識するというレクチンや抗体が多用されているが、いずれも特異性が曖昧であり、決定的な結論を導くには至っていない。このような状況に伴って、どのタンパク質のどの残基の O-GlcNAc 修飾が分化や増殖の機能に関与しているのかを特定する手法が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では、本来細胞質内には存在しない *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素を核内に発現させることにより、O-GlcNAc を伸長させて安定な糖鎖に導き、どのタンパク質のどのアミノ酸残基が O-GlcNAc 修飾を受けたかという履歴を、網羅的かつ正確に特定する新規手法の確立を目指す。具体的には可溶性 *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素を細胞質内に発現させ、かつ核内に移行させることにより、ヒストンや転写因子等の O-GlcNAc を伸長させ GalNAc-GlcNAc とし、O-GlcNAcase が作用できない安定な糖鎖に改変する (下図)。



通常の細胞内では O-GlcNAc 修飾は可逆的であることから、たまたま修飾されていた僅かなもののみを検出するに過ぎない。しかしながら本提案では、GalNAc-GlcNAc の糖鎖に誘導されたものは安定に細胞内に蓄積されるので、O-GlcNAc 修飾の履歴を確実に検出することができる。また、この GalNAc 1,3GlcNAc 改変糖鎖構造は哺乳動物での存在は報告されておらず、かつ、マメ科レクチンの WFA で特異的に検出することができる。特異的な WFA レクチンのアフィニティクロマトグラフィーで精製すると共に、二次元電気泳動後、トリプシン消化断片を用いた質量分析 (MS/MS) により、O-GlcNAc 修飾タンパク質の同定、及び修飾残基の特定を網羅的に行うことを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 核移行型 *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現

N-アセチルガラクトサミン転移酵素は II 型膜タンパク質であるので、シグナル配列及び膜貫通部位を除いた内腔領域をコードする cDNA を PCR で増幅し、さらに核移行シグナル及び FLAG タグ配列を付加した cDNA を作製する。対照として核内移行シグナルを付加しない cDNA も作製し、これらを発現ベクターに組み込み細胞に発現させる。細胞内での発現は、抗 Myc 抗体を用いて免疫染色を行い、改変 *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素の局在を調べる。また、糖転移酵素遺伝子に p53 由来の核移行シグナルを付加したものを発現させ、発現細胞を核および細胞質画分に分画した後、核移行配列の有無による局在を調べる。

(2) O-GlcNAc 糖伸長の検出

改変 *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素を核内に発現させた細胞の核画分および細胞質画分を調製し、O-GlcNAc の伸長した糖鎖の有無をフジ由来レクチンを用いたウエスタンブロットングで調べる。また、既に O-GlcNAc 修飾の存在が知られている核内のヒストン H1, H2A, B, H3, H4 を酸抽出法により精製を行った後、GalNAc-GlcNAc 糖鎖の増減を比較検討する。比較検討は電気泳動とフジ由来レクチンを用いたウエスタンブロットングを組み合わせ検出する。また細胞のライセートを二次元電気泳動とレクチンによるウエスタンブロットングにより O-GlcNAc 修飾タンパク質の網羅的検出を試みる。

(3) O-GlcNAc 糖伸長タンパク質のアフィニティ精製

フジ由来レクチンは、O-GlcNAc に *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素が作用して生成する GalNAc-GlcNAc を認識し結合する。そこで、

上記発現細胞の核画分をレクチンアフィニティカラムにかけ、結合するタンパク質を回収する。二次元電気泳動とフジ由来レクチンを用いたウエスタンブロットングによりスポットを特定すると共に、回収されたタンパク質混合物をトリプシンで消化し、再度、フジ由来レクチンカラムに結合する画分を回収することにより、GalNAc-GlcNAc糖鎖をもつペプチド断片を取得する。

(4) O-GlcNAc糖伸長タンパク質の同定と修飾残基の特定

2次元電気泳動及びフジ由来レクチン染色により特定されたスポットは、ゲル内トリプシン消化、質量分析 MALDI-TOF/TOF によりタンパク質の同定を行う。一方、トリプシン消化物のうち WFA レクチンに結合した画分は、次にナノ LC を用いて分取し、各フラクションを直接 MALDI-TOF/TOF 質量分析計により解析し、アミノ酸配列の決定、糖鎖修飾の位置の特定を行う。これら両者の結果を照らし合わせ、どのタンパク質のどの部位のアミノ酸が O-GlcNAc 修飾を受けていたかを明確に決定する。

4. 研究成果

(1) 核移行型N-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現

N-アセチルガラクトサミン転移酵素及び対照としてガラクトース転移酵素をコードする cDNA に p53 の核移行シグナル及び Myc タグ配列を付加した cDNA を作製した。これらを発現ベクター pGACCS に組み込み HEK293 細胞にトランスフェクションし、そのライセートを電気泳動し抗 Myc 抗体でウエスタンブロットングをおこない、それぞれの発現を確認した。トランスフェクション4日後の細胞のライセートを用いて、核画分・細胞質画分を分画し量的な比較を行ったが、核移行シグナル配列の有無による酵素の局在には大きな違いはなかった。

(2) O-GlcNAc修飾の検出

O-GlcNAc に GalNAc が転移した構造を認識するプローブとしてヤマフジ、ノダフジ、ナツフジの種子からレクチンを大量に精製した。ノダフジのレクチン (WFA) は既に知られていたが、ヤマフジおよびナツフジ由来のレクチンに関する報告はなく、糖鎖アレイ並びにフロントアルアフィニティクロマトグラフィーによる糖結合特異性による解析を行った。その結果、WFA およびヤマフジ由来レクチンは GalNAc に加えて Gal に親和性を持っていたのに対して、ナツフジ由来レクチン (WJA) は GalNAc に選択的に結合し、前者に比べて厳密な特異性を有していた (発表論文)。そこ

で、WJA を用いた検出を試みた。なお、O-GlcNAc 修飾の報告のある核内タンパク質ヒストンを酸抽出法を用いて精製し、これらのタンパク質の O-GlcNAc 伸長糖鎖を検出することとした。N-アセチルガラクトサミン転移酵素を発現させた細胞から、O-GlcNAc 加水分解酵素の阻害剤 thiamet G 処理条件下でヒストンの糖鎖修飾を WJA によるウエスタンブロットングによって追跡をした。その結果、ヒストン H2A, H2B, H3, H4 において強く染色された。

(3) O-GlcNAc修飾タンパク質のアフィニティ精製

上記の N-アセチルガラクトサミン転移酵素を発現させた細胞由来の細胞質、ならびに核画分を、WJA アフィニティカラムにアプライし、素通り画分および吸着画分を回収した。糖転移酵素を発現させない対照の細胞由来からも同様に素通り画分および吸着画分を回収した後、それぞれ電気泳動し、WJA によるレクチン染色を行った。しかしながら、これらの素通り画分および吸着画分に関して、明確な違いが認められなかったことから、O-GlcNAc 修飾の確認のできているヒストンタンパク質を用いて、同様の実験を行った。N-アセチルガラクトサミン転移酵素を発現させた細胞由来のヒストン精製画分を、トリプシンによる消化を行った。消化が完全に行われたか否かは、電気泳動によりバンドが消失することから確認した上で、WJA のアフィニティカラムにアプライした。素通り画分を回収した後、0.2M ラクトースを含む緩衝液で吸着画分を溶出した。得られた各フラクションは、全て C18 の逆相 HPLC により溶出パターンを調べた。各フラクションの連続的な溶出パターンを比較することにより、WJA カラムに吸着し、0.2M ラクトースで溶出されたペプチドと思われるピークが観察された。

(4) O-GlcNAc修飾タンパク質の同定と修飾残基の特定

コアヒストン H2B は 2 箇所、H2A, H3, H4 は 1 箇所の O-GlcNAc 修飾部位が知られている。そこで、電気泳動による分離の容易な N-アセチルガラクトサミン転移酵素を発現させた細胞由来の H2B と H4 に関して、SDS 電気泳動後、CBB 染色をしてゲルを切り出し、トリプシン消化後に質量分析へ供した。H2B では matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) 質量分析 (MS) で 4 つのペプチドが同定できたが、これらは O-GlcNAc 修飾ペプチドではなかった。H4 では 3 つのペプチドが同定され、そのうちの 1 つが O-GlcNAc 修飾を受けることが報告されているペプチドであったが、糖鎖の修飾は認められなかった。MALDI-TOF MS にお

いてレーザーで励起しイオン化する際に、ペプチドから糖が遊離することがあるらしく、エレクトロスプレーイオン化 (electron-spray ionization, ESI) のような他のソフトイオン化の方法を試みる必要があることが分かった。一方、WJA カラムに結合するヒストン由来のトリプシン消化ペプチドを回収する目的で、同じ条件でカラムにサンプルをアプライし、目的の溶出ピーク 2 つをマニュアルで回収した。この回収したサンプルを ZipTip C18 で濃縮したのち、MALDI-TOF 質量分析計及び ProteinPilot で解析を行った。しかしながら、ペプチドの同定には至らなかった。今後、ESI 質量分析計を用いた解析により、糖ペプチドの同定を試みる必要があることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Yamamoto, K. Intracellular lectins are involved in quality control of glycoproteins. *Proc. Jap. Acad. Ser.B.* 査読有 90, 67-82 (2014). DOI:10.2183/pjab.90.67

Soga, K., Teruya, F., Tateno, H., Hirabayashi, J., Yamamoto, K. Terminal *N*-acetylgalactosamine-specific leguminous lectin from *Wisteria japonica* as a probe for human lung squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 査読有 8(12) e83886 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0083886

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/iyaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 一夫 (YAMAMOTO, Kazuo)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号: 20174782

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし